



© BSN 2013

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun serta dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN
Gd. Manggala Wanabakti
Blok IV, Lt. 3,4,7,10.
Telp. +6221-5747043
Fax. +6221-5747045
Email: dokinfo@bsn.go.id
www.bsn.go.id

Diterbitkan di Jakarta

Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata	ii
1 Ruang lingkup.....	1
2 Acuan normatif.....	1
3 Istilah dan definisi	1
4 Persyaratan	1
5 Pengambilan contoh	2
6 Cara uji	2
7 Syarat lulus uji	3
8 Higiene.....	3
9 Syarat penandaan	3
10 Pengemasan.....	3
Lampiran A Persiapan contoh	4
Lampiran B Cara uji organoleptik	5
Lampiran C Cara uji aktifitas enzim diastase.....	6
Lampiran D Cara uji hidroksimetilfurfural (HMF)	9
Lampiran E Cara uji kadar air	11
Lampiran F Cara uji keasaman.....	13
Lampiran G Cara uji keasaman	14
Lampiran H Cara uji kloramfenikol.....	15
Lampiran I Cemarkan mikroba	17
Bibliografi	26
 Tabel 1 - Persyaratan mutu madu	 1
Tabel C.1 - Hubungan antara titik akhir pencampuran (menit) dengan absorban.....	7
Tabel E.1 - Hubungan indeks bias dengan kadar air pada madu ^{a)}	11
Tabel I.1 - APM/g contoh bila menggunakan 3 tabung untuk setiap tingkat pengenceran 0,1 g/mL; 0,01 g/mL; dan 0,001 g/mL contoh.....	18

Prakata

Standar Nasional Indonesia (SNI) Madu ini merupakan revisi SNI 01-3545-2004, *Madu*. Standar ini direvisi dan dirumuskan dengan tujuan sebagai berikut:

- Menyesuaikan standar dengan perkembangan teknologi terutama dalam metode uji dan persyaratan mutu;
- Menyesuaikan standar dengan peraturan-peraturan baru yang berlaku;
- Melindungi kesehatan konsumen;
- Menjamin perdagangan pangan yang jujur dan bertanggung jawab;

Standar ini dirumuskan dengan memperhatikan hal-hal yang tertera dalam:

- a) Undang-undang RI No. 7 tahun 1996 tentang Pangan;
- b) Undang-undang RI No. 8 tahun 1999 tentang Perlindungan Konsumen;
- c) Peraturan Pemerintah No. 69 tahun 1999 tentang Label dan Iklan Pangan;
- d) Peraturan Pemerintah No. 28 tahun 2004 tentang Keamanan, Mutu, dan Gizi Pangan;
- e) Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan RI No. HK.00.06.1.52.4011 tentang Penetapan Batas Maksimum Cemaran Mikroba dan Kimia dalam Makanan;
- f) Peraturan Menteri Perindustrian RI No. 24 tahun 2010 tentang Logo Tara Pangan dan Kode Daur Ulang Kemasan Plastik;
- g) Peraturan Menteri Perindustrian RI No. 75/M-IND/PER/7/2010 tahun 2010 tentang Pedoman Cara Produksi Pangan Olahan yang Baik.
- h) Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan RI No. HK.00.05.52.4040 tahun 2006 tentang Kategori Pangan

Standar ini disusun oleh Panitia Teknis 65-02, Hasil Hutan Bukan Kayu, Kementerian Kehutanan, yang telah dibahas melalui rapat teknis, dan disepakati dalam rapat konsensus pada tanggal 30 Nopember 2012 di Bogor Hadir dalam rapat tersebut perwakilan dari produsen, konsumen, pakar, dan regulator.

Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal 11 Februari 2013 sampai dengan tanggal 10 April 2013 dan langsung disetujui menjadi Rancangan Akhir SNI (RASNI) untuk ditetapkan menjadi SNI.

Madu

1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan persyaratan mutu, pengambilan contoh, cara uji, higiene, penandaan dan pengemasan untuk madu

2 Acuan normatif

Untuk acuan normatif tidak bertanggal, edisi terakhir yang berlaku (termasuk revisi dan atau amandemennya)

SNI 0428, *Petunjuk pengambilan contoh padatan*

SNI 2891, *Cara uji makanan dan minuman*

SNI 2892, *Cara uji gula*

SNI 2896, *Cara uji cemaran logam dalam makanan*

SNI 4866, *Cara uji cemaran arsen dalam makanan*

3 Istilah dan definisi

3.1 madu

cairan alami yang umumnya mempunyai rasa manis yang dihasilkan oleh lebah madu (*Apis sp.*) dari sari bunga tanaman (floral nektar) atau bagian lain dari tanaman (ekstra floral)

4 Persyaratan

Persyaratan madu seperti Tabel di bawah ini.

Tabel 1 - Persyaratan mutu madu

No	Jenis uji	Satuan	Persyaratan
A	Uji organoleptik		
1	Bau		Khas madu
2	Rasa		Khas madu
B	Uji laboratoris		
1	Aktivitas enzim diastase	DN	min 3 ^{*)}
2	Hidroksimetilfurfural (HMF)	mg/kg	maks 50
3	Kadar air	% b/b	maks 22
4	Gula pereduksi (dihitung sebagai glukosa)	% b/b	min 65
5	Sukrosa	% b/b	maks 5
6	Keasaman	ml NaOH/kg	maks 50
7	Padatan tak larut dalam air	% b/b	maks 0,5
8	Abu	% b/b	maks 0,5

Tabel 1 - Persyaratan mutu madu (lanjutan)

No	Jenis uji	Satuan	Persyaratan
9	Cemaran logam		
	9.1 Timbal (Pb)	mg/kg	maks 2,0
	9.2 Cadmium (Cd)	mg/kg	maks 0,2
	9.3 Merkuri (Hg)	mg/kg	maks 0,03
10	Cemaran arsen (As)	mg/kg	maks 1,0
11	Kloramfenikol		tidak terdeteksi
12	Cemaran mikroba:		
	12.1 Angka lempeng total (ALT)	koloni/g	$<5 \times 10^3$
	12.2 Angka paling mungkin (APM) koliform	APM / g	<3
	12.3 Kapang dan khamir	koloni/g	$<1 \times 10^1$
CATATAN *) Persyaratan ini berdasarkan pengujian setelah madu dipanen			

5 Pengambilan contoh

Sesuai dengan SNI 0428.

6 Cara uji

6.1 Persiapan contoh

Persiapan contoh sesuai Lampiran A.

6.2 Uji organoleptik

Cara uji organoleptik sesuai Lampiran B.

6.3 Aktivitas enzim diastase

Cara uji aktivitas enzim diastase sesuai Lampiran C.

6.4 Hidroksimetilfurfural (HMF)

Cara uji hidroksimetilfurfural sesuai Lampiran D.

6.5 Kadar air

Cara uji kadar air sesuai Lampiran E.

6.6 Kadar gula pereduksi

Cara uji gula sesuai dengan SNI 2892.

6.7 Kadar sukrosa

Cara uji sukrosa sesuai dengan SNI 2892.

6.8 Keasaman

Cara uji keasaman sesuai Lampiran F dan atau Lampiran G.

6.9 Padatan tak larut dalam air

Cara uji padatan tak larut dalam air sesuai dengan SNI 2891.

6.10 Kadar abu

Cara uji abu sesuai dengan SNI 2891.

6.11 Cemaran logam dalam makanan

Cara uji cemaran logam dalam makanan sesuai dengan SNI 2896.

6.12 Cemaran arsen

Cara uji cemaran arsen sesuai dengan SNI 4866.

6.13 Kloramfenikol

Cara uji kloramfenikol sesuai Lampiran H.

6.14 Cemaran mikroba

Cara uji cemaran mikroba sesuai dengan Lampiran I.

7 Syarat lulus uji

Produk dinyatakan lulus uji apabila memenuhi syarat mutu sesuai Tabel 1.

8 Higiene

Cara memproduksi madu yang higienis termasuk cara penyiapan dan penanganan yang sesuai dengan ketentuan yang berlaku tentang Pedoman Cara Produksi Pangan Olahan yang Baik.

9 Syarat penandaan

Syarat penandaan sesuai dengan ketentuan yang berlaku tentang Label dan Iklan Pangan.

10 Pengemasan

Madu dikemas dalam wadah yang tertutup rapat tidak dipengaruhi atau mempengaruhi isi, aman selama penyimpanan dan pengangkutan.

Lampiran A
(normatif)
Persiapan contoh

A.1 Persiapan contoh uji organoleptik

Buka kemasan contoh madu dan ambil contoh secukupnya, kemudian tempatkan contoh dalam wadah kaca yang bersih dan kering.

A.2 Persiapan contoh uji kimia

Contoh untuk penetapan enzim diastase dan hidroksimetilfurfural (HMF) tidak boleh dipanaskan. Jadi, penetapan dilakukan langsung dari contoh asal, tanpa perlakuan lain kecuali penyaringan, pengadukan dan pengocokan. Jika contoh tidak mengandung bagian-bagian yang menggumpal maka contoh cukup dikocok atau diaduk dengan baik. Jika mengandung bagian-bagian yang menggumpal, contoh dipanaskan dalam wadah tertutup diatas penangas air 60 °C – 65 °C selama 30 menit. Selama pemanasan, contoh digoyang/diaduk sewaktu-waktu dan didinginkan setelah mencair seluruhnya. Jika madu mengandung bahan asing seperti lilin lebah, partikel sarang lebah dan bahan-bahan asing lainnya maka madu harus dipanaskan sampai 40 °C diatas penangas air disaring dengan kain saring melalui corong yang dilengkapi dengan pemanasan oleh air panas.

A.3 Persiapan contoh uji mikrobiologi

Buka kemasan contoh, ambil contoh secara aseptik sesuai kebutuhan kemudian tempatkan dalam botol contoh steril.

Lampiran B
(normatif)
Cara uji organoleptik

B.1 Bau**B.1.1 Prinsip**

Pengamatan contoh uji dengan indera penciuman yang dilakukan oleh panelis yang terlatih atau kompeten untuk pengujian organoleptik.

B.1.2 Cara kerja

- a) Ambil contoh uji secukupnya dan letakkan di atas wadah yang bersih dan kering;
- b) cium contoh uji untuk mengetahui baunya;
- c) lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis yang terlatih atau 1 orang tenaga ahli.

B.1.3 Cara menyatakan hasil

- a) Jika tercium bau khas madu, maka hasil dinyatakan "normal"; dan
- b) jika tercium selain bau khas madu, maka hasil dinyatakan "tidak normal".

B.2 Rasa**B.2.1 Prinsip**

Pengamatan contoh uji dengan indera pengecap (lidah) yang dilakukan oleh panelis yang terlatih atau kompeten untuk pengujian organoleptik

B.2.2 Cara kerja

- a) Ambil contoh uji secukupnya dan rasakan dengan indera pengecap (lidah); dan
- b) lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis yang terlatih atau 1 orang tenaga ahli.

B.2.3 Cara menyatakan hasil

- a) Jika terasa khas madu, maka hasil dinyatakan "normal"; dan
- b) Jika tidak terasa khas madu, maka hasilnya dinyatakan "tidak normal".

Lampiran C
(normatif)
Cara uji aktifitas enzim diastase

C.1 Prinsip

Larutan madu dan pati yang telah didaparkan diinkubasi dan waktu yang dibutuhkan untuk mencapai titik akhir diukur secara fotometrik. Hasilnya dinyatakan dalam mL 1% pati terhidrolisis setara dengan enzim dalam 1 gram madu dalam satu jam.

C.2 Pereaksi**C.2.1 Larutan stock iod**

Larutan 8,80 g resublimasi I_2 (p.a) dalam 30ml-40ml air yang mengandung 22,0 g KI (p.a) dan encerkan dengan air sampai volume 1 liter.

C.2.2 Larutan iod 0,0007 N

Larutkan 20 g KI (p.a) dan 5,0 ml larutan stock iod dalam labu ukur 500 ml, encerkan dan tepatkan sampai tanda tera dengan air suling. Larutan harus diperbaharui setiap 2 hari sekali.

C.2.3 Larutan dapar asetat pH 5,3 (1,59 M)

Larutkan 87 g $CH_3COONa \cdot 3H_2O$ dalam 400 ml air, kemudian tambahkan kira-kira 10,5 ml larutan asam asetat dalam air. Tepatkan volumenya sampai 500 ml dengan penambahan air. Atur larutan sampai pH 5,3 dengan penambahan air, natrium asetat atau asam asetat jika perlu.

C.2.4 Larutan natrium klorida 0,5 M

Larutkan 14,5 g natrium klorida (p.a) dalam air suling yang telah dididihkan dan volumenya dibuat 500 ml. Larutan ini perlu sering diperbaharui karena mudah berjamur.

C.2.5 Larutan pati

Timbang 2,000 g pati dapat larut (dengan spesifikasi khusus untuk penetapan daya diastase dapat diperoleh dari beberapa pemasok (suplier) atau yang setara dan campurkan dengan 90 mL air suling dalam erlenmeyer 250 ml. Didihkan segera sambil sering diaduk. Kurangi pemanasan dan lanjutkan pendidihan secara hati-hati selama 3 menit, tutup dan biarkan dingin sampai suhu kamar. Pindahkan kedalam labu ukur 100 ml, encerkan dan tepatkan hingga tanda tera. Perhatikan dengan seksama keragaman nilai absorban blanko iod-pati.

C.2.6 Standardisasi

Pipet 5 ml larutan pati kedalam 10 ml air dan campur baik-baik. Kemudian pipet 1 ml campuran tersebut kedalam beberapa wadah (piala gelas erlenmeyer) 50 ml yang mengandung 10 ml larutan iod encer. Campurkan baik-baik bila perlu encerkan dengan air suling untuk memperoleh nilai absorban $0,760 \pm 0,02$.

C.3 Peralatan

- Fotometer fotoelektrik, pembacaan pada 660 nm (dengan filter merah) atau 600 nm (filterintervensi) dengan cell 1 cm.
- Panangas air, suhu $(40 \pm 0,2) ^\circ\text{C}$.
- Tabung reaksi. Hubungkan lengan sampai yang tertutup berukuran 18 mm x 60 mm, dengan tabung reaksi ukuran 18 mm x 175 mm. bagian bawah lengan sampai tertutup dihubungkan 100 mm dari bagian bawah tabung dengan membentuk sudut 45° dengan bagian bawah tabung.

C.4 Prosedur

C.4.1 Persiapan contoh

Timbang 5 gram madu masukkan ke dalam piala 20 ml, tambah 10 ml – 15 ml air dan 2,5 ml larutan dapar asetat (*buffer asetat*). Dalam keadaan dingin larutan diaduk sampai contoh madu larut seluruhnya. Pindahkan larutan contoh ini kedalam labu ukur 25 ml yang berisi 1,5 ml larutan NaCl, tepatkan sampai tanda tera dengan air (larutan harus didaparkan dahulu sebelum ditambahkan larutan NaCl).

C.4.2 Penetapan absorban

Pipet 10 ml larutan contoh, masukkan ke dalam tabung reaksi 50 ml, pipet 5 ml larutan pati melalui dinding bagian dalam tabung kemudian letakkan dalam penangas air $40 ^\circ\text{C} \pm 0,2 ^\circ\text{C}$ selama 15 menit. Kocok dan hidupkan stopwatch. Setiap interval waktu 5 menit, pipet 1 ml campuran contoh tersebut dan tambahkan kedalam 10,00 ml larutan iod. Campurkan, kemudian encerkan sampai volume seperti sebelumnya dan tetapkan nilai absorbannya pada panjang gelombang 660 nm. Catat waktu sejak pencampuran pati dengan madu sampai dengan pada penambahan cairan kepada iod sebagai waktu reaksi (letakkan pipet 1 mL dalam tabung reaksi untuk digunakan kembali apabila cairan diambil kembali). Lanjutkan pengambilan larutan dalam selang waktu tertentu sampai diperoleh nilai $A < 0,235$.

Tabel C.1 - Hubungan antara titik akhir pencampuran (menit) dengan absorban

Absorban	Titik akhir, menit
0,7	>25
0,65	20-25
0,60	15-18
0,55	11-13
0,50	9-10
0,45	7-10

C.5 Perhitungan

Plotkan nilai absorban terhadap waktu (menit) dari atas kertas milimeter. Garis lurus digambarkan melalui beberapa titik. Dari grafik ditetapkan waktu yang diperlukan untuk mencapai nilai absorban $(A) = 0,235$. Nilai 300 dibagi waktu yang diperlukan untuk mencapai nilai absorban (A) menunjukkan aktifitas enzim diastase (DN). Rumus aktifitas enzim diastase adalah:

$$DN = 300/t$$

Keterangan:

DN adalah aktivitas enzim diastase

T adalah waktu yang digunakan untuk mencapai nilai absorban (A)

CATATAN Pembacaan waktu 5 menit cukup untuk memperkirakan titik akhir dari contoh yang memiliki nilai DN yang tinggi (>35) apabila nilai lain diambil cukup cepat untuk mendapatkan A kira-kira 0,20. Guna memperoleh hasil yang teliti, ulangi penetapan dengan cara mengambil contoh setiap menit sejak awal. Bila contoh yang dimiliki DN yang rendah, pembacaan dimulai pada saat 10 menit.



Lampiran D
(normatif)
Cara uji hidroksimetilfurfural (HMF)

D.1 Prinsip

Perbedaan absorbansi contoh pada panjang gelombang 284 nm dari 336 nm dengan larutan natrium bisulfit (NaHSO_3) sebagai pembanding.

D.2 Perekasi**D.2.1 Larutan Carrez I**

Timbang 15 g kalium feroksianida $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, larutan dengan air dan encerkan sampai 100 mL.

D.2.2 Larutan Carrez II

Timbang 30 g seng asetat $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, larutkan dengan air dan encerkan sampai 100 mL.

D.2.3 Natrium bisulfit (NaHSO_3) 0,20%

Timbang 0,20 g NaHSO_3 , larutkan dengan air dan encerkan sampai 100 mL.

CATATAN Larutan natrium bisulfit harus setiap hari dibuat (larutan segar)

D.3 Peralatan

Spektrofotometer yang biasa dipakai harus mempunyai panjang gelombang 284 nm dan 336 nm, mempunyai sel 1 cm.

D.4 Prosedur

Timbang dengan teliti 5 g madu (sampai ketelitian 1 mg) dalam piala gelas kecil, masukkan ke dalam labu ukur 50 mL dan bilas dengan air sampai volume larutan 25 mL. Tambah 0,50 mL larutan Carrez I, kocok dan tambahkan 0,50 mL larutan Carrez II, kocok kembali dan encerkan dengan air sampai dengan tanda garis. Tambahkan setetes alkohol untuk menghilangkan busa pada permukaan. Saring melalui kertas saring, dan buang 10 mL saringan pertama.

Pipet 5 mL saringan dan masing-masing masukkan kedalam tabung reaksi 18 mL x 150 mL. pipet 5 mL air dan masukan kedalam salah satu tabung (contoh) dan 5 mL 0,20 % Natrium bisulfit kedalam tabung lainnya (pembanding). Kocok sampai tercampur sempurna (Vortex mixer) dan tetapkan absorbansi contoh terhadap referensi (pembanding) dalam sel 1 cm pada panjang gelombang 284 nm dan 336 nm. Bila absorbansi lebih tinggi dari 0,6 untuk memperoleh hasil yang teliti, larutan contoh diencerkan dengan air sesuai kebutuhan. Demikian juga dengan larutan pembanding (larutan referensi) encerkan dengan cara sama dengan menggunakan larutan NaHSO_3 0,1% nilai absorbansi yang diperoleh dikalikan dengan faktor pengenceran sebelum perhitungan.

D.5 Perhitungan

$$\text{HMF} \left(\frac{\text{mg}}{100} \text{ g madu} \right) = \frac{A_{284} - A_{336} \times 14,97 \times 5}{\text{bobot contoh (g)}}$$

$$\text{Faktor: } \frac{126}{216\,830} \times \frac{1\,000}{10} \times \frac{100}{5} = 14,97$$

Keterangan:

126	adalah bobot molekul HMF;
16 830	adalah absorbansifitas molar HMF pada panjang gelombang 284 nm;
1 000	adalah mg/g;
10	adalah sentiliter/L;
100	adalah gram madu yang dilaporkan;
5	adalah bobot contoh yang diambil dalam gram.



Lampiran E (normatif) Cara uji kadar air

E.1 Prinsip

Pembacaan nilai indeks bias madu pada suhu 20 °C, atau suhu pembacaan yang telah dikoreksi 20 °C, menunjukkan besarnya kadar air dari contoh madu.

E.2 Peralatan

Refraktometer

E.3 Prosedur

Tetapkan pembacaan nilai indeks bias contoh pada suhu 20 °C dengan menggunakan alat refraktometer. Cari kandungan air dalam contoh dengan membandingkan nilai indeks bias dan air pada Tabel E.1 dibawah ini. Jika penetapan tidak dibulatkan pada suhu 20 °C, hitung nilai koreksi suhu itu sebagaimana yang tertera dalam catatan kaki.

Tabel E.1 - Hubungan indeks bias dengan kadar air pada madu ^{a)}

Indeks bias (20 °C) ^{b)}	Kadar air (%)	Indeks bias (20 °C) ^{b)}	Kadar air (%)
1.5044	13.0	1.4890	19.0
1.5038	13.2	1.4885	19.2
1.5033	13.4	1.4880	19.4
1.5028	13.6	1.4875	19.6
1.5023	13.8	1.4870	19.8
1.5018	14.0	1.4865	20.0
1.5012	14.2	1.4860	20.2
1.5007	14.4	1.4855	20.4
1.5002	14.6	1.4850	20.6
1.4997	14.8	1.4845	20.8
1.4992	15.0	1.4840	21.0
1.4987	15.2	1.4835	21.2
1.4982	15.4	1.4830	21.4
1.4976	15.6	1.4825	21.6
1.4971	15.8	1.4820	21.8
1.4966	16.0	1.4815	22.0
1.4961	16.2	1.4810	22.2
1.4956	16.4	1.4805	22.4
1.4951	16.6	1.4800	22.6
1.4946	16.8	1.4795	22.8

Tabel E.1 - Hubungan indeks bias dengan kadar air pada madu ^{a)} (lanjutan)

Indeks bias (20 °C)b)	Kadar air (%)	Indeks bias (20 °C)b)	Kadar air (%)
1.4940	17.0	1.4790	23.0
1.4935	17.2	1.4785	23.2
1.4930	17.4	1.4780	23.4
1.4925	17.6	1.4775	23.6
1.4920	17.8	1.4770	23.8
1.4915	18.0	1.4765	24.0
1.4910	18.2	1.4760	24.2
1.4905	18.4	1.4755	24.4
1.4900	18.6	1.4750	24.6
1.4895	18.8	1.4745	24.8
		1.4740	25.0
Keterangan ^{a)} adalah nilai untuk 200 °C merupakan nilai perhitungan Wedmore's (Bee World 36, 197 (1955). Nilai > 22 % diperoleh dari FAO/WHO Codex Committee on Methods of Analysis and Sampling (1968). ^{b)} adalah jika nilai indeks bias diukur pada suhu di bawah 200 °C ditambahkan 0,000023 OC dan bila pengukuran dilakukan pada suhu 200 °C, kurangkan 0,000023/OC. Hasilnya kemudian dicocokkan dengan tabel.			

Lampiran F
(normatif)
Cara uji keasaman

F.1 Prinsip

Netralisasi asam dengan basa.

F.2 Peralatan

- a) neraca analitik terkalibrasi ;
- b) buret 10 ml, terkalibrasi ;
- c) erlenmeyer 250 ml.

F.3 Perekasi

- a) larutan natrium hidroksida, NaOH 0,1 N, bebas karbonat ;
- b) indikator fenofalein, pp 1% dalam etanol, netral ;
- c) air suling, bebas CO₂.

F.4 Prosedur

- a) Timbang dengan teliti 10,0 g madu, masukkan kedalam erlenmeyer 250 ml kemudian larutkan dengan 75 ml air suling dan tambahkan 4 - 5 tetes indikator PP;
- b) titar dengan larutan NaOH 0,1 N sampai titik akhir yang tetap selama 10 detik;
- c) catat volume NaOH 0,1 N yang digunakan untuk titrasi;
- d) sebagai alternatif, dapat digunakan pH meter dan contoh dititar sampai pH 8,3;
- e) hitung keasaman dalam madu.

F.5 Perhitungan

$$\text{Keasaman (ml N NaOH/kg)} = \frac{a \times b}{c} \times 1\,000$$

Keterangan:

- a adalah volume NaOH 0,1 N yang digunakan dalam titrasi, dinyatakan ml;
- b adalah normalitas NaOH 0,1 N.
- c adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram.

Lampiran G
(normatif)
Cara uji keasaman

G.1 Prinsip

Netralisasi asam dengan basa

G.2 Peralatan

- a) gelas piala 250 ml;
- b) magnetik stirer;
- c) pH meter;
- d) pipet.

G.3 Perekasi

- a) larutan NaOH 0,05 M
- b) air suling bebas CO_2

G.4 Prosedur

- a) Larutkan 10 g contoh, dengan 75 mL air bebas CO_2 dalam piala gelas 250 ml. Aduk menggunakan magnetik stirrer, masukkan pH meter dan catat pH. Titrasi dengan 0.05 M NaOH dengan kecepatan 5.0 mL/min. Hentikan titrasi apabila mencapai pH 8.50.
- b) Pipet 10 ml 0.05M NaOH, titrasi segera dengan 0.05M HCl sehingga mencapai pH 8.30.
- c) Lakukan pengerjaan blanko, 75 mL air bebas CO_2 dititar dengan NaOH sampai pH 8.5.

G.5 Perhitungan

Perhitungan dinyatakan sebagai ml ekuivalen/kg dengan menggunakan persamaan:

- a) *Asam Bebas* = $(\text{ml } 0,05\text{M NaOH dari buret} - \text{ml blank}) \times N \text{ NaOH} \times 1\,000 / \text{gram contoh}$
- b) *Lactone* = $(10,00 - \text{ml } 0,05\text{M HCl dari buret}) \times N \text{ HCl} \times 1\,000 / \text{gram contoh}$
- c) *Total keasaman* = *asam bebas* + *lactone*

Lampiran H
(normatif)
Cara uji kloramfenikol

H.1 Peralatan

- a) agilent 1260 infinity LC
- b) agilent 6430 LC-QQQ
- c) beaker glass
- d) test tube

H.2 Perekasi

- a) standar kloramfenikol
- b) etil asetat LC grade
- c) asetonitril LC grade
- d) amonium asetat atau amonium format

H.3 Prosedur**H.3.1 Preparasi sampel**

- a) timbang madu 1.0 ± 0.01 g dalam tabung sentrifugasi 25ml dan tambahkan internal standar kerja CAP-d5 dan larutkan dengan 2.0 ml air;
- b) tambah 2.0 ml Heksan, kocok sentrifugasi dan fasa atas di buang;
- c) tambahkan ke fasa air 4 ml ethyl Acetate, kocok, sentrifugasi dan fasa Ethyl acetate di evaporasi sampai kering di bawah aliran nitrogen yang menggunakan heating blok dengan suhu 45 °C;
- d) larutkan kembali residu yang kering tersebut dengan 0.5 ml mobil phases acetonitril : air (50/50, v/v);
- e) filter melewati disposable filter 0.45 um;
- f) injek di LCMS sebanyak 20 um.

H.3.2 Preparasi standar

- a) preparasi larutan stok standar 1.0 mg/ml dengan melarutkan 100 mg CAP ke dalam labu 100 ml dengan acetonitrile;
- b) encerkan 50 kali dengan acetonitrile sehingga di hasilkan larutan standard intermediate 20 ug/ml;
- c) buat larutan kerja CAP yang 50 ng/ml dengan melarutkan larutan stok dengan acetonitrile;
- d) preparasi internal standard CAP-d5 dengan melarutkan ampoule 100ug/ml dalam acetonitrile, yang mana larutkan internal standard tadi ditambahkan pada working solution 1.5 ng/ml;
- e) simpan semua larutan standard pada suhu -20 °C dan terlindung dari cahaya selama tidak lebih 3 bulan.

H.3.3 Kondisi Liquid chromatography

- a) Column : C18 Luna column (150 x 2 mm i.d., 5 mm) (Phenomenex, Torrance, USA)
- b) Flow Rate: 0.2ml/min
- c) Column Oven: 40 °C
- d) Mobile Phase A : Air (80%)

- e) Mobile Phase b : Acetonitrile (20%)
- f) Inject Volume : 20 μ l
- g) Program gradient linear mobile phase seperti dibawah

Waktu (min)	Air (%)	Acetonitrile (%)
0.0 – 0.1	80	20
0.1 – 7.0	0.0	100
7.0 – 7.3	80	20
7.3 - 20	80	20

- h) Dengan menggunakan kondisi diatas maka waktu retensi CAP dan CAP-d5 tedapat di kisaran waktu 6.8 menit.

H.3.4 Kondisi Mass spectrometry

- a) kondisikan Analisa MS pada API 3000 triple stage quadrupole mass spectrometer (Applied Biosystems, Foster City, CA,USA) dengan interface turbo –ion spray. Temperatur source blok 400 °C dan voltage capillary electrospray -3500V. Nitrogen sebagai gas collision.
- b) Deteksi MS dalam polarity negative menggunakan Multiple Reaction Monitoring (MRM).
- c) Monitoring Empat transisi pada m/z 321,257; 321,194; 321, 152; 326,157(IS) dan untuk quantifikasi yang dipilih adalah transisi m/z 321,257;
- d) Transisi monitoring MRM untuk CAP dan Internal standard CAP-d5 dengan collision energi masing masing

Compound	Precursor m/z	Product m/z	Collision energy (eV)
CAP	321	152	18
CAP	321	194	14
CAP	321	257	14
CAP-d5	326(IS)	157	23

Lampiran I (normatif) Cemaran mikroba

I.1 Koliform

I.1.1 Prinsip

Pertumbuhan coliform ditandai dengan terbentuknya gas pada tabung *Durham*, yang diikuti dengan uji biokimia dan selanjutnya dirujuk pada Tabel APM (Angka Paling Mungkin).

I.1.2 Peralatan

- a) Inkubator (35 ± 1) °C, terkalibrasi;
- b) Penangas air tertutup dengan sistem sirkulasi, ($45,5 \pm 0,2$) °C;
- c) Rak untuk tabung reaksi;
- d) Pipet ukur 10 mL berskala 1 mL dan 1 mL berskala 0,1 mL steril;
- e) Botol pengencer terbuat dari gelas borosilikat, dengan tutup ulir plastik;
- f) Tabung reaksi
- g) Tabung Durham;
- h) Cawan petri gelas/plastik steril (ukuran 15 mm x 100 mm atau 15 mm x 90 mm); dan
- i) Jarum Ose, dengan diameter dalam kira-kira 3 mm.

I.1.3 Perbenihan, pengencer dan pereaksi

- a) *Lauryl sulfate tryptose (LST) broth* / *Lauryl tryptose (LT) broth*;
- b) *Brilliant green lactose bile (BGLB) broth* 2%;
- c) *Butterfield's Phosphate-Buffered Dilution Water (BPB)*;

I.1.4 Cara kerja

I.1.4.1 APM – Uji pendugaan untuk coliform

- a) Lakukan persiapan dan homogenisasi contoh sesuai dengan A.10.1.6;
- b) inokulasikan masing-masing 1 mL larutan dari setiap tingkat pengenceran (larutan 10^{-1} , 10^{-2} dan 10^{-3}) ke dalam tiga tabung *Lauryl sulfate tryptose (LST) broth* yang didalamnya terdapat tabung *Durham* terbalik. Pegang pipet sedemikian sehingga ujung bawah pipet menempel pada tabung. Biarkan isi pipet mengalir 2 detik sampai dengan 3 detik. Pipet jangan ditiup untuk mengeluarkan isinya;
- c) masukkan tabung-tabung tersebut ke dalam inkubator pada suhu 35 °C selama (48 ± 2) jam;
- d) amati tabung-tabung tersebut pada pada jam ke-(24 ± 2). Jika ada tabung yang telah mengandung gas, maka tabung tersebut dinyatakan "positif";
- e) tabung-tabung yang belum mengandung gas dinyatakan "negatif", lanjutkan inkubasi selama 24 jam;
- f) catat adanya pembentukan gas dalam jumlah berapapun setelah inkubasi (48 ± 2) jam, dan nyatakan tabung tersebut "positif"; dan
- g) lakukan uji penegasan terhadap semua tabung yang positif dalam uji pendugaan.

I.1.4.2 APM – Uji penegasan untuk koliform

- Pindahkan satu Ose dari setiap tabung LST *broth* yang positif ke dalam tabung BGLB *broth* yang berlainan,
- inkubasikan tabung-tabung BGLB *broth* tersebut ke dalam inkubator pada suhu 35 °C selama (24 ± 2) jam, tabung yang telah terbentuk gas dinyatakan “positif”,
- apabila negatif, inkubasikan dan periksa kembali pada jam ke-(48 ± 2). Jika telah terbentuk gas maka tabung tersebut dinyatakan “positif”, dan
- Hitunglah APM coliform dengan menggunakan Tabel A.1 APM berdasarkan jumlah tabung - tabung dari 3 seri pengenceran yang telah dipastikan mengandung coliform

Tabel I.1 - APM/g contoh bila menggunakan 3 tabung untuk setiap tingkat pengenceran 0,1 g/mL; 0,01 g/mL; dan 0,001 g/mL contoh

Tabung yang positif			APM	Tabung yang positif			APM
0,1	0,01	0,001		0,1	0,01	0,001	
0	0	0	<3,0	2	2	0	21
0	0	1	3,0	2	2	1	28
0	1	0	3,0	2	2	2	35
0	1	1	6,1	2	3	0	29
0	2	0	6,2	2	3	1	36
0	3	0	9,4	3	0	0	23
1	0	0	3,6	3	0	1	38
1	0	1	7,2	3	0	2	64
1	0	2	11	3	1	0	43
1	1	0	7,4	3	1	1	75
1	1	1	11	3	1	2	120
1	2	0	11	3	1	3	160
1	2	1	15	3	2	0	93
1	3	0	16	3	2	1	150
2	0	0	9,2	3	2	2	210
2	0	1	14	3	2	3	290
2	0	2	20	3	3	0	240
2	1	0	15	3	3	1	460
2	1	1	20	3	3	2	1100
2	1	2	27	3	3	3	>1100

I.2 Persiapan dan homogenisasi contoh untuk uji Coliform

I.2.1 Prinsip

Pembebasan sel-sel bakteri yang mungkin terlindung oleh partikel makanan dan untuk menggiatkan kembali sel-sel bakteri yang mungkin viabilitasnya berkurang karena kondisi yang kurang menguntungkan dalam makanan. Persiapan dan homogenisasi contoh bertujuan agar bakteri terdistribusi dengan baik di dalam contoh makanan yang ditetapkan.

I.2.2 Peralatan

- Alat homogenisasi (blender) dengan kecepatan 10 000 rpm sampai dengan 12 000 rpm;
- Otoklaf;
- Pemanas listrik;
- Neraca kapasitas 2 000 g terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 g;
- Labu ukur 1 000 mL, 500 mL, 100 mL, dan 50 mL terkalibrasi;
- Gelas piala steril;
- Labu Erlenmeyer steril;
- Botol pengencer steril;
- Pipet volumetrik steril 10,0 mL dan 1,0 mL terkalibrasi, dilengkapi dengan *bulb* atau *pipettors*;
- Tabung reaksi; dan
- Sendok, gunting dan spatula steril.

I.2.3 Larutan pengencer

Butterfield's Phosphate-Buffered Dilution Water (BPB);

- KH_2PO_4 34 g
- aquabides 500 mL

Larutkan bahan-bahan di atas dan atur pH dengan NaOH sehingga mencapai pH 7,2, tepatkan volume sampai 1 000 mL dengan aquabides. Sterilisasi pada suhu 121 °C selama 15 menit, simpan pada refrigerator. Untuk membuat larutan pengencer, 1,25 mL larutan stok diencerkan dengan air suling sampai volume 1 000 mL. Larutan tersebut dimasukkan ke dalam botol pengencer sebanyak 450 mL dan ke dalam tabung reaksi sebanyak 9 mL dan disterilisasi pada suhu 121 °C selama 15 menit.

I.2.4 Homogenisasi contoh

- Timbang 50 g contoh secara aseptik ke dalam botol pengencer yang telah berisi 450 mL larutan pengencer steril sehingga diperoleh pengenceran 1:10; dan
- kocok campuran beberapa kali sehingga homogen.

I.3 Angka lempeng total

I.3.1 Prinsip

Pertumbuhan bakteri mesofil aerob setelah contoh diinkubasikan dalam pembenihan yang sesuai selama 72 jam pada suhu (30 ± 1) °C.

I.3.2 Peralatan

- Inkubator (30 ± 1) °C terkalibrasi;
- Oven/alat sterilisasi kering terkalibrasi;
- Otoklaf;
- Penangas air bersirkulasi (45 ± 1) °C;
- Alat penghitung koloni;
- Botol pengencer 160 mL, terbuat dari gelas borosilikat, dengan sumbat karet atau tutup ulir plastik;
- Pipet ukur 1 mL steril dengan skala 0,1 mL dilengkapi *bulb* atau *pipettor*; dan
- Cawan petri gelas/plastik steril (berukuran minimal 15 mm x 90 mm).

I.3.3 Pembenihan dan pengenceran

a) *Buffered peptone water* (BPW)

- Peptone 10 g
- Natrium klorida 5 g
- Disodium hidrogen fosfat 3,5 g
- Kalium dihidrogen fosfat 1,5 g
- Air suling 1 L

Larutkan bahan-bahan diatas menjadi 1 000 mL dengan air suling dan atur pH menjadi 7,0. Masukkan ke dalam botol pengencer. Sterilkan dengan menggunakan otoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit.

b) Peptone 0,1 %

- Peptone 1 g
- Air Suling 1 L

Larutkan bahan-bahan dalam 1 L air suling, atur pH 7,0, masukkan 225 mL atau 450 mL ke dalam botol (labu) 500 mL dan 9 mL ke dalam tabung reaksi. Sterilkan pada suhu 121 °C selama 20 menit.

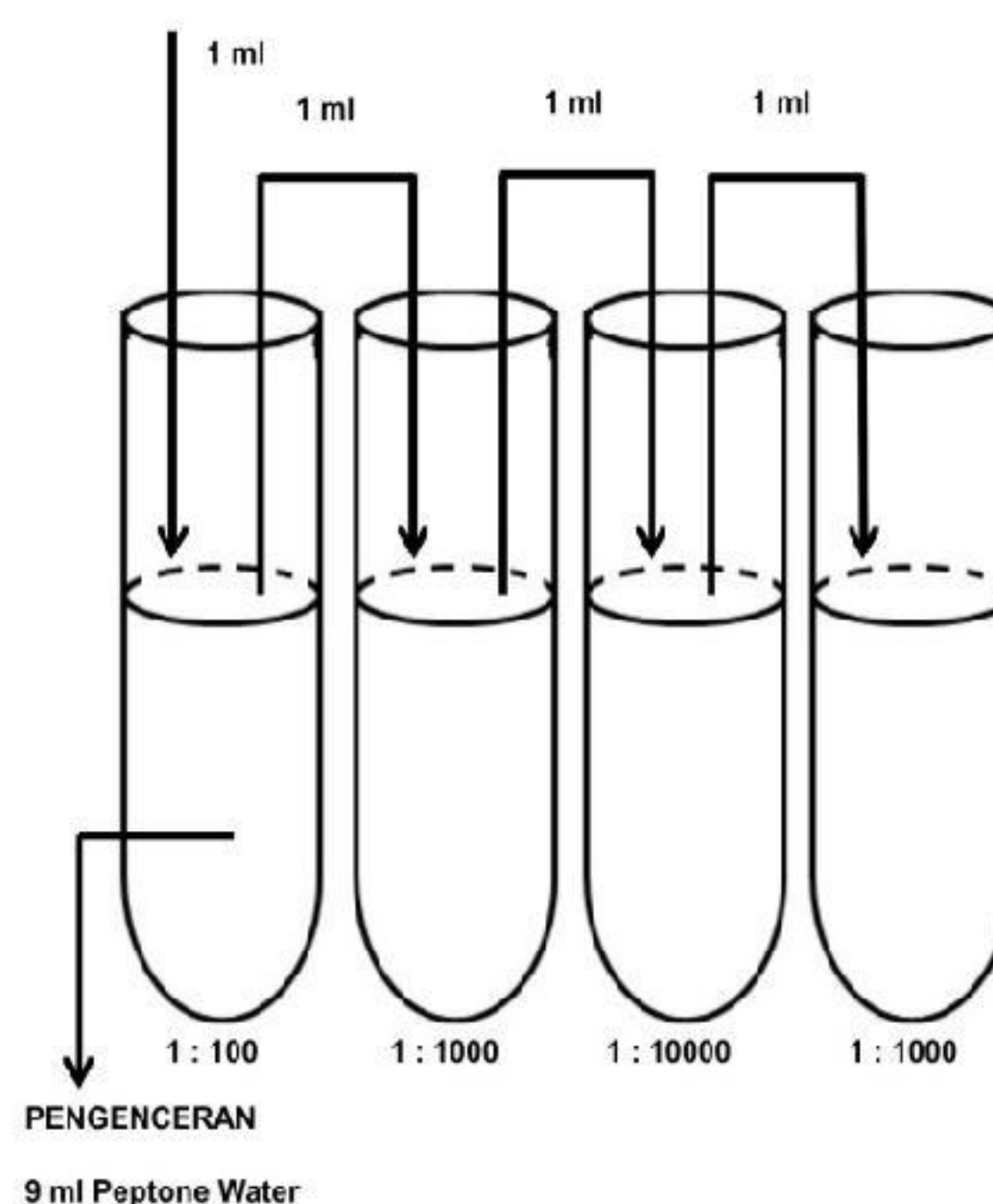
c) *Plate count agar* (PCA)

- *Yeast extract* 2,5 g
- *Pancreatic digest of caseine* 5 g
- Glukosa 1 g
- Agar 15 sampai dengan 20 g
- Air suling 1 L

Larutkan semua bahan-bahan, atur pH 7,0. Masukkan dalam labu, sterilkan pada 121 °C selama 15 menit.

I.3.4 Prosedur

- a) Timbang 25 g contoh, masukkan ke dalam erlenmeyer yang telah berisi 225 mL larutan pengencer hingga diperoleh pengenceran 1:10. Kocok campuran beberapa kali hingga homogen. Pengenceran dilakukan sampai tingkat pengenceran tertentu sesuai keperluan seperti pada Gambar J.1.



Gambar I.1 Metoda pengenceran

- b) Pipet masing-masing 1 mL dari pengenceran 10^1 - 10^5 ke dalam cawan petri steril secara duplo.
 c) Ke dalam setiap cawan petri tuangkan sebanyak 12 mL sampai dengan 15 mL media

PCA yang telah dicairkan yang bersuhu $(45 \pm 1) ^\circ\text{C}$ dalam waktu 15 menit dari pengenceran pertama.

- d) Goyangkan cawan petri dengan hati-hati (putar dan goyangkan ke depan dan ke belakang serta ke kanan dan ke kiri) hingga contoh tercampur rata dengan pembenihan.
- e) Kerjakan pemeriksaan blanko dengan mencampur air pengencer dengan pembenihan untuk setiap contoh yang diperiksa.
- f) Biarkan hingga campuran dalam cawan petri membeku.
- g) Masukkan semua cawan petri dengan posisi terbalik ke dalam lemari pengering dan inkubasikan pada suhu $30 ^\circ\text{C}$ selama 72 jam.
- h) Catat pertumbuhan koloni pada setiap cawan petri yang mengandung (25 - 250) koloni setelah 48 jam.
- i) Hitung angka lempeng total dalam 1 g contoh dengan mengalikan jumlah rata-rata koloni pada cawan petri dengan faktor pengenceran yang digunakan.

I.3.5 Pernyataan hasil

I.3.5.1 Cara menghitung

- a) Pilih cawan petri dari satu pengenceran yang menunjukkan jumlah koloni antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni setiap cawan petri. Hitung semua koloni dalam cawan petri menggunakan alat penghitung koloni. Hitung rata-rata jumlah koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per gram;
- b) jika salah satu dari dua cawan petri terdapat jumlah koloni lebih kecil dari 25 koloni atau lebih besar dari 250 koloni, hitung jumlah koloni yang terletak antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per gram;

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}
120	25
105	20

$$\text{ALT} = \frac{120 + 105 + 25}{[(1 \times 2) + (0,1 \times 1) \times 10^{-2}]} = 124,9375$$

- c) jika hasil dari dua pengenceran jumlahnya berturut-turut terletak antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni, hitung jumlah koloni dari masing-masing pengenceran koloni per g dengan rumus:

$$\text{ALT} = \frac{\sum C}{[(1 \times n_1) + (0,1 \times n_2) \times d]}$$

Keterangan:

- C adalah jumlah koloni dari tiap-tiap petri;
 n_1 adalah jumlah petri dari pengenceran pertama yang dihitung;
 n_2 adalah jumlah petri dari pengenceran kedua; dan
d adalah pengenceran pertama yang dihitung;

Contoh :

$$\begin{array}{r} 10^{-2} \quad 10^{-3} \\ 131 \quad 30 \\ 143 \quad 25 \\ \hline \text{ALT} = \left[\frac{131 + 143 + 30 + 25}{(1 \times 2) + (0,1 \times 2) \times 10^{-2}} \right] = 164,3357 \end{array}$$

- d) jika jumlah koloni dari masing-masing petri lebih dari 25 koloni nyatakan sebagai jumlah bakteri perkiraan;
- jika jumlah koloni per cm^2 kurang dari 100 koloni, maka nyatakan hasilnya sebagai jumlah perkiraan : jumlah bakteri dikalikan faktor pengenceran.

Contoh :

$$\begin{array}{r} 10^{-2} \quad 10^{-3} \quad \text{Jumlah bakteri perkiraan} \\ \sim \quad 640 \quad 1000 \times 640 = 640.000 (6,4 \times 10^5) \end{array}$$

- jika jumlah koloni per cm^2 lebih dari 100 koloni, maka nyatakan hasilnya: area x faktor pengenceran x 100 contoh rata-rata jumlah koloni 110 per cm^2
- Contoh :

$$\begin{array}{r} 10^{-2} \quad 10^{-3} \quad \text{area (cm}^2\text{)} \quad \text{jumlah bakteri perkiraan} \\ \sim \quad 7150 \quad 65 \quad > 65 \times 10^3 \times 100 = > 6.500.000 (6,5 \times 10^6) \\ \sim \quad 6490 \quad 59 \quad > 59 \times 10^3 \times 100 = > 5.900.000 (5,9 \times 10^6) \end{array}$$

- e) jika jumlah koloni dari masing-masing koloni yang tumbuh pada cawan petri kurang dari 25, maka nyatakan jumlah bakteri perkiraan lebih kecil dari 25 koloni dikalikan pengenceran yang terendah; dan
- f) menghitung koloni yang merambat.

Perambatan pada koloni ada 3 macam, yaitu :

- perambatan berupa rantai yang tidak terpisah;
- perambatan yang terjadi diantara dasar cawan petri dan pembenihan; dan
- perambatan yang terjadi pada pinggir atau permukaan pembenihan.

Jika terjadi hanya satu perambatan (seperti rantai) maka koloni dianggap satu. Jika terbentuk lebih dari satu rantai, dan berasal dari sumber yang terpisah-pisah, maka tiap sumber dihitung sebagai satu koloni.

1.3.5.2 Cara membulatkan angka

Dalam melaporkan jumlah koloni atau jumlah koloni perkiraan hanya 2 angka penting yang digunakan, yaitu angka pertama dan kedua (dimulai dari kiri),

- Jika angka ketiga lebih besar dari 5, maka bulatkan ke atas;
contohnya : 528 dilaporkan sebagai 530 penulisannya $5,3 \times 10^2$
- jika angka ketiga kurang dari 5, maka bulatkan kebawah; dan
contohnya : 523 dilaporkan sebagai 520 penulisannya $5,2 \times 10^2$
- jika angka ketiga sama dengan 5, maka bulatkan sebagai berikut
 - bulatkan ke atas jika angka kedua merupakan angka ganjil; dan
contohnya : 575 dilaporkan sebagai 580 penulisannya $5,8 \times 10^2$
 - bulatkan ke bawah jika angka kedua merupakan angka genap
contohnya : 565 dilaporkan sebagai 560 penulisannya $5,6 \times 10^2$

I.4 Koliform

I.4.1 Prinsip

Pertumbuhan *Coliform* setelah contoh diinkubasikan dalam pembenihan yang sesuai selama 18 jam sampai dengan 24 jam pada suhu 35 °C, kemudian dilakukan uji penegasan menggunakan tabung BGLB *broth*.

I.4.2 Peralatan

- Inkubator (35 ± 1) °C, terkalibrasi;
- Pipet ukur 1 mL steril dengan skala 0,1 mL dilengkapi bulb dan pipettor; dan
- Cawan petri gelas/plastik steril (berukuran minimal 15 mm x 90 mm).

I.4.3 Perbenihan, pengenceran, dan pereaksi

- Violet red bile agar* (VRBA);

- Yeast extract	3	g
- Pepton atau gelysate	7	g
- Sodium klorida	5	g
- Garam bile no. 3	1,5	g
- Laktosa	10	g
- Neutral red	0,03	g
- Crystal violet	0,002	g
- agar	15	g
- air suling	1 000	mL

Masukkan bahan-bahan di atas ke dalam 1 000 mL air suling, panaskan sampai mendidih hingga semua bahan larut. Sterilkan pada suhu 121 °C, selama 5 menit dan tepatkan pH akhir (7,4±0,2).

- Brilliant green lactoes bile (BGLB) broth 2%; dan
- Tryptic soy agar

I.4.4 Prosedur

- Lakukan persiapan dan homogenisasi contoh seperti pada A.10.1;
- inokulasikan masing-masing 1 mL larutan dari setiap tingkat pengenceran 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³ dan 10⁻⁴ ke dalam cawan petri dan tuang dengan 10 mL VRBA bersuhu 48°C, kemudian goyang cawan untuk meratakan. Biarkan memadat, kemudian tuang lagi dengan 5 mL VRBA, dinginkan dan biarkan memadat. Lakukan duplo;
- jika pengkayaan diperlukan, tuangkan 8 mL sampai dengan 10 mL *tryptic soy agar* sebagai lapisan dasar dan kondisikan suhu 48 °C. Goyang cawan hingga agar rata kemudian inkubasi pada suhu ruang selama (2 ± 0,5) jam. Kemudian lapisi dengan 8 mL sampai dengan 10 mL VRBA cair kemudian diamkan hingga membeku dan memadat;
- balikkan cawan dan inkubasikan pada 18 jam sampai dengan 24 jam pada 35 °C;
- amati cawan di bawah penyorotan kaca pembesar. Hitung koloni warna ungu kemerahan yang berdiameter 0,5 mm atau lebih besar dan dikelilingi oleh gumpalan asam *bile*. Koloni cawan harus berjumlah sekitar 25 koloni sampai dengan 250 koloni. Kemudian dilanjutkan dengan uji penegasan untuk koloni yang positif;
- uji penegasan dilakukan dengan memindahkan sedikitnya 10 mata ose koloni yang mewakili, pindahkan masing-masing koloni ke dalam tabung BGLB *broth*;
- inkubasikan tabung pada 35 °C. Amati setelah 24 sampai dengan 48 jam terhadap terbentuknya gas; dan
- tabung yang menghasilkan gas dianggap sebagai positif *Coliform*.

I.4.5 Perhitungan

$$\text{Coliform (koloni/g)} = n \times \frac{a}{b} \times F$$

Keterangan:

- n adalah rata-rata koloni dari dua cawan petri dari satu pengenceran, dinyatakan dalam koloni per gram (koloni/g) yang diduga sebagai *Coliform*;
- a adalah jumlah koloni yang sudah ditegaskan sebagai *Coliform* (ditunjukkan dengan pembentukan gas pada tabung BGLB);
- b adalah jumlah koloni yang diambil dari koloni yang diduga sebagai *Coliform*;
- F adalah faktor pengenceran dari rata-rata koloni yang dipakai.

I.4.6 Pernyataan hasil

I.4.6.1 Cara menghitung

Hitung koloni *Coliform* sesuai dengan I.4.5

I.4.6.2 Cara membulatkan angka

Cara membulatkan angka pada hasil perhitungan *Coliform* sesuai dengan I.2.5.2.

I.5 Kapang Khamir

I.5.1 Prinsip

Pertumbuhan kapang dan khamir dalam media yang sesuai, setelah diinkubasikan pada suhu $(25 \pm 1) ^\circ\text{C}$ selama 5 hari.

I.5.2 Peralatan

- a) Inkubator $(25 \pm 1) ^\circ\text{C}$, terkalibrasi;
- b) Otoklaf;
- c) Penangas air $(45 \pm 1) ^\circ\text{C}$;
- d) pH meter;
- e) Alat penghitung koloni;
- f) Pipet ukur 10 mL dan 1 mL;
- g) Cawan petri gelas/plastik (berukuran minimal 15 mm x 100 mm), steril; dan
- h) *Bent glass rod*.

I.5.3 Pembenihan, pengencer, dan pereaksi

- a) Agar *Dichloran rose bengal chloramphenicol* (DRBC);
- b) Agar *Dichloran 18% glycerol* (DG 18);
- c) Larutan pepton 0,1 %; dan
 - Pepton 1 g
 - Air suling 1 000 mL

Larutkan pepton dalam air suling, kemudian sterilkan dengan menggunakan otoklaf pada suhu $121 ^\circ\text{C}$ selama 15 menit, dan atur pH sehingga mencapai pH akhir $(7,0 \pm 0,2)$.

- d) Larutan antibiotik.

Antibiotik ditambahkan dalam media kapang dan khamir untuk mencegah pertumbuhan bakteri. *Chloramphenicol* adalah salah satu pilihan antibiotik, karena stabil selama proses dalam otoklaf. Konsentrasi antibiotik yang dianjurkan adalah 100 mg/L media. Jika

terlihat pertumbuhan bakteri yang berlebihan, siapkan media dengan penambahan *chloramphenicol* 50 mg/L sebelum otoklaf dan *chlortetracycline* 50 mg/L steril saat media mulai dikondisikan, tepat sebelum menuang media dalam cawan.

I.5.4 Persiapan dan homogenisasi contoh

- Timbang 50 g contoh secara aseptik ke dalam botol pengencer yang telah berisi 450 mL larutan pepton 0,1 % steril sehingga diperoleh pengenceran 1:10; dan
- Kocok campuran beberapa kali sehingga homogen.

I.5.5 Prosedur

- Buat tingkat pengenceran dari 10^{-2} sampai dengan 10^{-6} , dengan menggunakan larutan pepton 0,1 %;
- Persiapan media dalam cawan dapat dilakukan dengan salah satu metode di bawah ini, yaitu:
 - metode sebar (media DRBC atau DG 18), penggunaan media DG 18 lebih sesuai untuk contoh uji yang mempunyai a_w kurang dari 0,95 :
pipet 0,1 mL masing-masing pengenceran secara aseptik ke dalam media dan sebar merata dengan menggunakan *bent glass rod*.
 - metode tuang (media DG 18) :
Pipet 1,0 mL masing-masing pengenceran ke dalam cawan petri dan sesegera mungkin tuangkan 20 mL sampai dengan 25 mL media;
 - campurkan dengan menggoyang cawan secara perlahan searah jarum jam, kemudian berlawanan arah jarum jam selama 1 menit sampai dengan 2 menit; dan
 - biarkan hingga campuran dalam cawan petri memadat.
- masukkan semua cawan petri dengan posisi tidak terbalik ke dalam inkubator pada ruang gelap bersuhu 25 °C selama 5 hari. Jangan menumpuk cawan lebih dari 3 tumpukan. Biarkan cawan dan jangan merubah posisinya;
- hitung koloni pada cawan setelah 5 hari inkubasi. Jika setelah 5 hari tidak ada yang tumbuh, tambahkan waktu inkubasi selama 48 jam. Jangan menghitung koloni dalam cawan sampai batas waktu inkubasi berakhir, karena merubah posisi cawan dapat mengakibatkan pertumbuhan sekunder dari spora; dan
- nyatakan hasil perhitungan sebagai koloni per gram contoh.

I.5.6 Pernyataan hasil

Pilih cawan petri dari satu pengenceran yang menunjukkan jumlah koloni antara 10 koloni - 150 koloni setiap cawan petri. Hitung semua koloni dalam cawan petri dengan menggunakan alat penghitung koloni. Hitung rata-rata jumlah koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah kapang per g.

Keterangan:

- Koloni kapang biasanya buram dan berbulu.
- Koloni khamir berwarna putih dan licin (berbau asam).
- Tegaskan koloni dengan pemeriksaan di bawah mikroskop sehingga yakin bahwa koloni tersebut adalah kapang.

Bibliografi

- AOAC Official Method of Analysis 920.180-2005 *Honey (liquid, strained or comp) preparation of test sample*
- AOAC Official Method of Analysis 958.09-2005 *Diastatic Activity of Honey*
- AOAC Official Method of Analysis 962.19-2005 *Acidity (Free, Lactone, and Total) of Honey*
- AOAC Official Method of Analysis 969.38-2005 *Moisture of Honey*
- AOAC Official Method of Analysis 980.23-2005 *Hydroxymethylfurfural in Honey*
- American Oil Chemists' Society. 1993. *AOCS Official Method Ca 5a-40, Free Fatty Acids*. 4th Edition.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 986.15, Arsenic, Cadmium, Lead, Selenium, and Zinc in Human and Pet Foods, Multielement Method*, 18th Edition, Chapter 9.1.01.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 999.11, Lead, Cadmium, Copper, Iron, and Zinc in Foods: Atomic Absorption Spectrophotometry after Dry Ashing*, 18th Edition, Chapter 9.1.09.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 971.21, Mercury in Foods, Flameless Atomic Absorption Spectrophotometric Method*, 18th Edition, Chapter 9.2.22.
- Codex Standards for Sugars (including honey). CAC /Vol.III-Ed 1,1981.
- Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 2002. *Enumeration of Escherichia coli and The Coliform Bacteria*. Chapter 4.
- Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 2003. *Food Sampling and Preparation of Sample Homogenate*. Chapter 1.
- Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 2001. *Mold, Yeast and Mycotoxin*. Chapter 18.
- ISO 4833:2003 (E). *Microbial of Food and Animal Feeding Stuffs-Horizontal Method for The Enumeration of Microorganism – Colony Count Tehnique at 30 °C*.
- SNI 7387:2009, Batas maksimum cemaran logam berat dalam pangan.
- SNI 7388:2009, Batas maksimum cemaran mikroba dalam pangan.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 986.15, Sugars and sugars product*
- Honey Quality and International Regulatory Standards: Review by The International Honey Commission*.
- ISO 6887-1: 1999, *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilution for microbiological examination – Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions*